

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

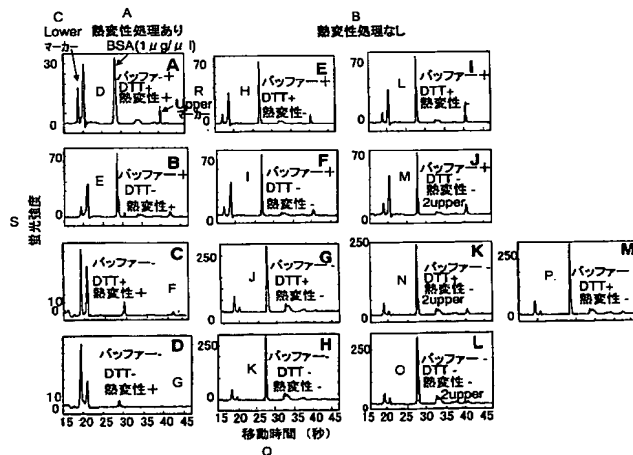
(10) 国際公開番号
WO 03/058229 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 27/447 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13491 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田淵 眞理 (TABUCHI, Mari) [JP/JP]; 〒770-0038 徳島県 徳島市 南佐古八番町 4-2 Tokushima (JP). 馬場 嘉信 (BABA, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒770-0047 徳島県 徳島市 名東町一丁目 1 1 4-1 5 Tokushima (JP).
(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 25 日 (25.12.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願 2001-400640 2001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591 大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMMビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
(81) 指定国 (国内): CA, CN, KR, US.
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ELECTROPHORESING PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質の電気泳動法



A...HEAT-DENATURED
B...NOT HEAT-DENATURED
C...LOWER MARKER
D...BUFFER A + DTT + THERMAL DENATURATION
E...BUFFER B + DTT + THERMAL DENATURATION
F...BUFFER C + DTT + THERMAL DENATURATION
G...BUFFER D + DTT + THERMAL DENATURATION
H...BUFFER E + DTT + THERMAL DENATURATION
I...BUFFER F + DTT + THERMAL DENATURATION
J...BUFFER G + DTT + THERMAL DENATURATION
K...BUFFER H + DTT + THERMAL DENATURATION

L...BUFFER I + DTT + THERMAL DENATURATION
M...BUFFER J + DTT + THERMAL DENATURATION-2
UPPER
N...BUFFER K + DTT + THERMAL DENATURATION-2
UPPER
O...BUFFER L + DTT + THERMAL DENATURATION-2
UPPER
P...BUFFER M + DTT + THERMAL DENATURATION
Q...MIGRATION TIME (SEC)
R...UPPER MARKER
S...PHOSPHOR

(57) Abstract: It is intended to provide an electrophoresis method with an elevated sensitivity whereby a protein can be quickly analyzed in the native state without resort to any pretreatment for heat denaturation. This electrophoresis method is useful in analyzing a proteosome and medicinal diagnosis.

[続葉有]



添付公開書類：
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

熱変性の前処理工程を行わずにネイティブな状態でタンパク質を迅速に解析することができ、なおかつより高感度な電気泳動法を提供すること。本発明の電気泳動法は、プロテオソーム解析および医療診断に有用である。

明 細 書

タンパク質の電気泳動法

技術分野

本発明は、タンパク質の高速、かつ高感度な電気泳動法に関する。

背景技術

タンパク質は、一般にはSDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）法に基づき、サイズ分離され、検出される。これをキャピラリー電気泳動に応用したものがSDS-CGE（キャピラリーゲル電気泳動）であり、これをさらにマイクロチップ型電気泳動に応用した方法として、Protein 200キットを用いたAgilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies社製）での解析が挙げられる。タンパク質は、ネイティブな状態では種々の電荷を有しており、正に荷電したタンパク質は正電場では移動がおこらないことが考えられる。そのため、前記従来法では、通常、全ての被検タンパク質が負電荷を有するように、前処理としてタンパク質の熱変性処理を行う必要がある。熱変性処理は通常、界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液と2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールなどの還元剤中でタンパク質を95～100℃で数分間加熱することにより達成される。2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールはS-S結合の切断のために、また、SDSは全てのタンパク質の電荷を負電荷にするために用いられる。

それ故、マイクロチップ型電気泳動により分析工程が高速化されたとしても、SDS-PAGE法やSDS-CGE法などの従来法ではこの前処理工程の時間は短縮されず、操作が煩雑であるという欠点を有している。そのため、より迅速

なタンパク質の電気泳動法が望まれている。さらに、生体試料を解析する場合、試料中の極めて微量のタンパク質を解析する必要があり、より高感度な電気泳動法が望まれている。

発明の開示

本発明は、熱変性の前処理工程を行わずにネイティブな状態でタンパク質を迅速に解析することができ、なおかつより高感度な電気泳動法を提供することを目的とする。

即ち、本発明の要旨は、

〔１〕 タンパク質を熱変性処理することなくサイズ分離の電気泳動に供することを特徴とする電気泳動法、

〔２〕 水溶解させたタンパク質を電気泳動に供することを特徴とする前記〔１〕記載の電気泳動法、

〔３〕 ２つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの少なくとも１つを標準濃度と比較して低濃度とすることを特徴とする前記〔１〕または〔２〕記載の電気泳動法、

〔４〕 ２つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの１つを被検タンパク質の濃度の１／１０～１０倍の濃度にすることを特徴とする前記〔１〕～〔３〕いずれか記載の電気泳動法、

〔５〕 電気泳動の形態が、キャピラリー電気泳動法、マイクロチップ型電気泳動法およびナノチャンネル型電気泳動法からなる群より選択されたものである前記〔１〕～〔４〕いずれか記載の電気泳動法、に関する。

図面の簡単な説明

第１図は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示

す図である。

第2図は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

第3図は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

第4図は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

第5図は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

第6図は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

第7図は、マイクロチップ型電気泳動において、泳動条件を検討した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のタンパク質の電気泳動法は、タンパク質を熱変性処理することなくサイズ分離を目的とした電気泳動に供することを1つの大きな特徴とする。本発明の電気泳動法は、熱変性処理を行わないことにより、電気泳動の分析時間を短縮化することができ、操作を簡便化することができるという利点を有する。

本明細書において、タンパク質とは、複数のアミノ酸がペプチド結合により連結された化合物をいい、天然由来物、合成物、および短鎖のペプチドをも含むことを意味する。

本発明の電気泳動法において解析されうるタンパク質としては、特に限定されことなく、天然由来物、合成物およびアミノ酸以外の構成成分を含む核タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質等を解析することができるが水溶性タンパク質に特に好適に使用される。測定可能な分子サイズは、マーカーを適宜設定す

ることによりあらゆるサイズのタンパク質が解析可能となるが、特に 6 kDa ~ 210 kDa のタンパク質が好適に解析されうる。なお、膜結合したタンパク質等は可溶化後に本発明の電気泳動法に適用されるのが好ましい。そのための可溶化処理は塩溶液や EDTA などのキレート剤、超音波等の機械的処理、または界面活性剤での処理等により達成される。

本発明の電気泳動法に使用する分離用担体としては、特に限定されるものではなく、通常のキャピラリーゲル電気泳動またはマイクロチップ型ゲル電気泳動等においてタンパク質の分子サイズ分離分析用として使用される、ポリアクリルアミド、ポリアクリルアミドゲル、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、 β -シクロデキストリン、 α -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン等の分離用担体が挙げられ、また、WO 02/097421 記載の β -1, 3 グルカン構造を含むカードラン、ラミナランや海藻抽出物等にも適用可能である。分離用担体の添加剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、Triton X-100、 ε -アミノカプロン酸、3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアミノ]-1-プロパン、CHAPS、6~8 M 尿素、テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、ヘキシルトリメチルアンモニウムブロマイド (HTAB)、ドデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (DTAB) 等が挙げられる。

泳動用緩衝液としては、例えば、トリス-グリシンバッファー、トリス-ホウ酸バッファー、トリス-塩酸バッファー、トリス-トリシンバッファー、トリス-リン酸二水素ナトリウムバッファー等や、一般にタンパク質の電気泳動用緩衝液として使用される緩衝液が挙げられ、市販のタンパク質電気泳動用キット中に提供されている緩衝液等も使用することができる。前記泳動用緩衝液は、一般にタンパク質の電気泳動用緩衝液として使用される濃度で使用する事ができる。

泳動用緩衝液は、前記分離用担体を含有していてもよい。分離用担体を泳動用

緩衝液に添加して用いることにより、操作を簡便にすることができ、解析をより高速で行うことができる。

泳動用緩衝液のpHは、適切な電気浸透流およびタンパク質の好適な電気泳動の観点から、2.0～9.0が好ましく、6.8～8.6がより好ましい。

試料調製用溶液としては、水、SDS溶液、またはSDS-トリスホウ酸溶液等に2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールを添加したもの等を使用することができる。ピーク強度の向上、ピーク分離度の向上、検出限界の向上、測定精度の向上の観点から、水が特に好ましい。

水としては、超純水、脱イオン水、MilliQ水等、タンパク質の電気泳動に通常使用される水が使用されうるが、MilliQ水が特に好ましい。

また、水を試料調製用溶液として使用する場合、ピーク強度の増強、検出限界の向上の観点から、タンパク質を水溶解させることが好ましい。

試料溶液中のタンパク質の濃度としては、測定精度の観点から、0.05～2000 ng/ μ lが好ましく、0.1～2000 ng/ μ lがより好ましく、0.5～200 ng/ μ lが特に好ましい。

本発明の電気泳動法が使用されうる好ましい形態としては、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ型電気泳動、およびナノチャンネル型電気泳動が挙げられる。

キャピラリー電気泳動は、通常、内径が100 μ m以下のキャピラリー内に泳動用緩衝液を充填し、一端側に試料を導入した後、両端間に高電圧を印加して被検タンパク質をキャピラリー内で展開させるものである。キャピラリーとしては、フューズドシリカキャピラリーが通常用いられ、その内壁がコーティングされていないもの、内壁がコーティングされているもの（50%フェニルメチルポリシロキサン、ポリエチレングリコール、ポリアミン等）が用いられる。また、コーティングなしのものにPEO（ポリエチレンオキサイド）等で処理したものも用いられる。

キャピラリー電気泳動の形態では、本発明の電気泳動法は、具体的には、タンパク質を含む試料を熱変性させることなく、試料をキャピラリーにインジェクトし、タンパク質の分離が可能な泳動電場下にタンパク質を移動させる工程、および泳動電場によりタンパク質を泳動させる工程を含むプロセスにより行なわれる。

試料をキャピラリーにインジェクトし、タンパク質の分離が可能な泳動電場下にタンパク質を移動させる工程は、より具体的には、電圧法、加圧法、落差法により行われるが、装置の種類や、キャピラリーの太さ（内径）や長さ等により、電圧や加える圧力の大きさおよびそれらに供する時間が適宜決められる。さらに、WO 02/097421 記載の方法も適用可能である。

キャピラリー電気泳動に使用されるキャピラリーにおいて、内径、外径、全長、有効長は、特に限定されるものではなく、通常使用されるサイズのものが使用されうる。有効長に関して、高速での解析を可能にする観点から、短い有効長のキャピラリーを用いることができる。ここで、キャピラリーの有効長とは、試料注入口から検出部までの距離をいう。

キャピラリー電気泳動における泳動電場は、良好な分離能を得、移動時間を短縮する観点から、好ましくは、 $20\text{ V/cm} \sim 10\text{ kV/cm}$ であり、より好ましくは、 $50\text{ V/cm} \sim 5\text{ kV/cm}$ であり、特に好ましくは $100\text{ V/cm} \sim 1\text{ kV/cm}$ であることが望ましい。

マイクロチップ型電気泳動においては、ローディングチャンネルと、該ローディングチャンネルに交差する分離用チャンネルとを備え、かつ該ローディングチャンネルの一端に試料リザーバーが配置され、該ローディングチャンネルの他端にアウトレットが配置されたマイクロチップが用いられる。

マイクロチップ型電気泳動の形態では、本発明の電気泳動法は、具体的には、タンパク質を含む試料を熱変性させることなく、試料リザーバーに試料を供する工程、該試料リザーバー中の試料を分離用チャンネルに導入する工程、および分離

用チャンネルにおいて試料を泳動させる工程を含むプロセスにより行なわれる。

試料リザーバーに試料を供する工程は、より具体的には、ローディングチャンネルの一端の試料リザーバーと他端のアウトレットに電圧をかけることにより達成される。電圧の強さは装置により異なるが、SV1100（日立電子社製）の場合、50～800V、通常300Vの電圧がかけられる。これにより試料がローディングチャンネルと分離用チャンネルの交差部に供される。一方、WO02/097421記載の方法も適用可能である。

試料リザーバー中の試料を分離用チャンネルに導入する工程は、より具体的には、ローディングチャンネルの一端の試料リザーバーとその他端のアウトレットにスクイー징電圧をかけ、余分な試料を試料リザーバーとその他端のアウトレット側に排出する工程および分離用チャンネルのアウトレット側と、その反対側に分離電圧をかける工程が同時に達成される。電圧の強さは装置により適宜選択されるが、SV1100（日立電子社製）の場合、前者は130V前後、後者は700～900Vで達成される。一方、WO02/097421記載の方法も適用可能である。

マイクロチップの材質としては、例えば、石英ガラス、ホウケイ酸ガラス、ソーダガラス、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ジメチルシロキサンなどが挙げられる。なかでも、試料の吸着が少なく、チップ加工が容易である観点から、ガラス、またはポリメチルメタクリレートが望ましい。また、キャピラリーと同様に内壁を加工処理したものも用いられる。

マイクロチップ型電気泳動においては、マイクロチップの大きさは、例えば、縦10～120mm、横10～120mm、厚さ500～5000μmである。

マイクロチップにおけるローディングチャンネルおよび分離用チャンネルのそれぞれの形状は特に限定されるものではない。なお、前記チャンネルが一枚のチップ上に3～96本設置された、同時に多チャンネルを解析することができるチップを使用することもできる。多チャンネルの並べ方は、並行、放射線状、円形状等がある

が、その形状は特に限定されるものではない。

前記チャネルの幅は、マイクロチップの大きさ、使用目的などにより適宜設定されうる。具体的には、チャネルの幅は、十分な解析感度を得る観点から、0.1 μm 以上、好ましくは10 μm 以上であり、十分な解析精度を得る観点から、100 μm 以下、好ましくは50 μm 以下であることが望ましい。また、前記チャネルの深さは、マイクロチップの大きさ、使用目的などにより適宜設定されうる。具体的には、十分な解析感度を得る観点から、0.1 μm 以上、好ましくは10 μm 以上であり、十分な解析精度を得る観点から、100 μm 以下、好ましくは50 μm 以下であることが望ましい。さらに、前記分離用チャネルの長さは、マイクロチップの大きさ、解析対象の化合物に応じて適宜選択することができるが、有効長を、より長くすることが望ましい。有効長は、チャネル交差部から、高分子化合物の検出点（分離用チャネル上に配置）までの距離をいう。十分な分離能を得る観点から、0.1 mm以上、好ましくは10 mm以上であり、高速分離の観点から、100 mm以下、好ましくは50 mm以下であることが望ましい。

また、前記リザーバーの大きさは、試料の容量に応じて適宜設定することができる。具体的には、試料導入のハンドリングおよび電極の太さの観点から、直径0.05 mm以上、好ましくは3 mm以下であることが望ましい。

マイクロチップ型電気泳動における泳動電場は、良好な分離能を得、移動時間を短縮する観点から、20 V/cm～50 kV/cmであり、好ましくは、50 V/cm～20 kV/cmであり、より好ましくは100 V/cm～10 kV/cmであることが望ましい。

ナノチャネル型電気泳動とは、ナノメートルサイズ、1 nm～1 μm 、好ましくは10～500 nm、より好ましくは50～100 nmのチャネル幅からなる流路が形成されたチップを用いて行なわれる電気泳動をいう。これには上記記載のナノサイズの構造体がマイクロメートルサイズのチャネルに形成されているも

のを含む。ナノサイズの構造体の形状は、特に限定されることなく、例えば、四角、丸、三角等のものが使用され得、構造体の設置間隔も特に限定されない。これらが形成されたナノチャネルチップが用いられる。キャピラリー電気泳動の場合と同様に同時に多チャネル解析可能なチップも含まれる。

ナノチャネル型電気泳動におけるチャネルは、サイズがナノメートルという特徴をもつチャネルの形状が曲率を曲げたもの、蛇行状、ジグザグ状またはそれらの組み合わせ等、様々な設計が可能である。このことにより、微小スケール内に多くのチャネルを形成できる。また、このことにより一度に多数のサンプルを処理することができ、ハイスループット化が可能である。またナノサイズの構造体がマイクロメートルサイズのチャネルに形成される場合、その形状を自在に変えることができ、その設置間隔も自在に変えられるという利点をもつ。同時に多チャネルの測定が可能である。

ナノチャネル型電気泳動においてもマイクロチップ型電気泳動と同様にローディングチャネル、該ローディングチャネルに交差する分離用チャネル、該ローディングチャネルの一端に試料リザーバー、該ローディングチャネルの他端にアウトレットが配置されたものを含むが、形状は特に限定されるものではない。

ナノチャネル型電気泳動に用いられるナノチャネルチップの材質としては、マイクロチップと同様のものが用いられる。例えば、石英ガラス、ホウケイ酸ガラス、ソーダガラス、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ジメチルシロキサンなどが挙げられる。

ナノチャネル型電気泳動におけるナノチャネルチップの大きさはマイクロチップと同様のものが適用される。例えば縦10～120mm、横10～120mm、厚さ500～5000μmである。ナノチャネルチップのチャネルの深さ、チャネルの長さ、リザーバーの大きさ等はマイクロチップに準ずる。

本発明のタンパク質の電気泳動法においては、分子量マーカーをタンパク質試料と共に電気泳動に供することができる。分子量マーカーとしては、Agile

nt Technologies No. 5065-4430の分子サイズ6 kDa、分子サイズ210 kDaのMyosin、HMW、LMWマーカーキット（Amersham Pharmacia Biotech社）等のタンパク質の電気泳動に通常使用される市販の分子量マーカーや、市販の分子量および濃度既知の標準試料のタンパク質や生体試料から精製および／または定量したタンパク質を含む分子量マーカーを用いることができる。これらの分子量マーカーは組み合わせ使用することもできる。

本発明のタンパク質の電気泳動法では、分子量マーカーとして、被検タンパク質に対して測定可能な範囲内で低分子量側および高分子量側になるような2つの分子量マーカーを用いることもできる。これにより、より良好な移動時間の調整と定量が達成されうる。本明細書中では、低分子量側の分子量マーカーを「Lowerマーカー」とよび、高分子量側の分子量マーカーを「Upperマーカー」とよぶ。

Lowerマーカーとしては、例えば、分子サイズ6 kDaのAgilent Technologies No. 5065-4430が挙げられる。Upperマーカーとしては、例えば、分子サイズ210 kDaのMyosinが挙げられる。

本発明のタンパク質の電気泳動法では、LowerマーカーおよびUpperマーカーに他の分子量マーカーを組み合わせ使用することもできる。

分子量マーカーの使用量としては、タンパク質の電気泳動で一般に使用される量で使用されうる。装置の種類、その装置における検出限界、検出感度、測定精度等に応じて製造業者または一般的なプロトコルにより推奨される試料溶液中の分子量マーカーの濃度を本明細書中ではタンパク質の電気泳動に通常使用される濃度として、「標準濃度」とよぶ。例えば、Agilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies社製）においては、被検濃度、検出感度、測定精度の観点から、試料溶液中74 ng/ml前後が

特に好ましく、この濃度が標準濃度となる。

本発明のタンパク質の電気泳動法では、2以上の分子量マーカースを使用する場合、少なくとも1つの分子量マーカースを標準濃度と比べて低濃度、好ましくは標準濃度の $1/30 \sim 1/2$ 、より好ましくは $1/15 \sim 1/3$ 、特に好ましくは $1/10 \sim 2/7$ の濃度で使用するにより、分析対象のタンパク質の検出感度を向上することができる。これは、低濃度領域の目盛りを拡大することにより、検出感度が検出精度を上回るためである。さらに希釈マーカースを用いることにより既製マーカース溶液中のイオンを希釈することができる。一方、泳動中のイオン強度が低いほど感度は高いため、最終的に感度を上昇させることができる。

前記態様において、Lowerマーカースおよび/またはUpperマーカース標準濃度と比べて低濃度にして使用することもできる。Lowerマーカースを標準濃度と比べて低濃度で使用する場合には、好ましくは標準濃度の $1/30 \sim 1/2$ の濃度、より好ましくは $1/15 \sim 1/3$ の濃度、特に好ましくは $1/10 \sim 2/7$ の濃度で、一方、Upperマーカースを標準濃度と比べて低濃度で使用する場合には、好ましくは標準濃度の $1/20 \sim 2/3$ の濃度、より好ましくは $1/15 \sim 1/3$ の濃度、特に好ましくは $1/10 \sim 2/7$ の濃度で使用するにより、分析対象のタンパク質の検出感度を向上することができる。また、Lowerマーカースおよび/またはUpperマーカースをそれぞれの標準濃度よりも低濃度で使用し、さらに他のマーカースを組み合わせ使用することもできる。

また、本発明のタンパク質の電気泳動法では、2以上のマーカースを使用する場合、その内の1つを、測定試料における被検タンパク質の濃度と実質的に同等もしくは近似した濃度にするにより、被検タンパク質の検出感度を向上することができる。これは、被検タンパク質と実質的に同等もしくは近似した濃度に分子量マーカースの濃度が設定されること、およびマーカースの目盛に近い位置で測定が行なわれることにより、精度よく測定することができるためである。被検タンパク質の濃度と実質的に同等もしくは近似した濃度とは、具体的には、測定試料

における被検タンパク質の濃度の、好ましくは $1/10 \sim 10$ 倍、より好ましくは $1/5 \sim 5$ 倍、特に好ましくは $1/2 \sim 2$ 倍である。

前記態様において、Lowerマーカ―またはUpperマーカ―をさらに組み合わせて使用することもできる。また、Lowerマーカ―またはUpperマーカ―を被検タンパク質の濃度と同等もしくは近似した濃度にして使用することもできる。また、被検タンパク質と同等もしくは近似した濃度でLowerマーカ―またはUpperマーカ―を使用し、さらに他の分子量マーカ―を組み合わせて使用することもできる。

電気泳動に供したタンパク質の検出法としては、例えば、UV波長光による吸収、蛍光、レーザー、ランプ、LEDなどによる検出、電気化学的検出、化学発光検出などが挙げられる。具体的には、タンパク質またはペプチドの場合、 200 nm における吸収を測定すること；SYPRO Orangeとタンパク質またはペプチドとを反応させ、 $460 \sim 550 \text{ nm}$ で励起させ、 $550 \sim 650 \text{ nm}$ で蛍光を測定すること、あるいはタンパク質と蛍光マーカ―（Agilent Technologies No. 5065-4430）と反応させ、 $630 \sim 650 \text{ nm}$ で励起させ、 $670 \sim 700 \text{ nm}$ で蛍光を測定すること、および電気化学的測定、化学発光測定などにより、タンパク質またはペプチドを検出することができる。

キャピラリー電気泳動においては、例えば、キャピラリーのアウトレットに、UV波長光を発しうる装置と該UV波長光の検出器とを設置してもよく、あるいは蛍光波長を発しうる装置と該蛍光波長を検出可能な検出器とを設置してもよい。

マイクロチップ型電気泳動においては、例えば、分離用チャネル上に配置された検出点にUV波長光の検出器を設置してもよく、あるいは、蛍光波長を発しうる装置と該蛍光波長を検出可能な検出器とを設置してもよい。また同時に多チャネルを検出可能である。

ナノチャネル型電気泳動においては、マイクロチップ型電気泳動の場合と同じ検出器、検出方法が適用される。さらにナノチャネル型電気泳動においては、同時多チャネル検出の際、マイクロチップ型電気泳動の場合よりも多数のサンプルを同時に検出可能である。

検出の際、タンパク質、ペプチド、アミノ酸などの同定を行う場合には、UV吸収、分子量マーカー、標品との移動時間の比較、マスペクトルの解析などにより行うことができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例中、タンパク質の電気泳動は全てAgilent Technologies社のマイクロチップ型電気泳動装置Agilent 2100 Bioanalyzerおよび同社のProtein 200 Kitを用いて行なった。従来法は、Agilent Technologies推奨のプロトコールにより行なった。具体的には以下の1～7の工程を含む。

1. $3\mu\text{l}$ のUpperマーカーに $90\mu\text{l}$ の変成処理用緩衝液と $3\mu\text{l}$ の 100mM のジチオスレイトールを加え、ボルテックスにより5秒間混合する。
2. Lowerマーカー $15\mu\text{l}$ の原液をとり、 1.0ml のmilliQ水と混合する。
3. $3\mu\text{l}$ のラダー液およびそれと別に上記1. で作製した変成処理用緩衝液の混合物 $2\mu\text{l}$ と $4\mu\text{l}$ の被検タンパク質サンプルを入れてボルテックスで混合し、 $1000\times g$ で5秒間遠心する。
4. 上記3のサンプルを 100°C で5分間加熱する。
5. 加熱終了後1～2分間放冷する。
6. 加熱・放冷処理後のラダー液および被検タンパク質液に上記2. で調製したLowerマーカー液を $84\mu\text{l}$ ずつ加えて混合する。

7. 上記6の調製物を各6 μ l ずつ被検サンプルとして電気泳動に供する。

なお、本発明のタンパク質の電気泳動法では、従来法との比較のために、上記 Agilent Technologies 推奨のプロトコルを基にして、各実施例に記載の変更点を加えてタンパク質の電気泳動を行った。

Lower マーカーとして、分子サイズ6 kDa の Agilent Technologies No. 5065-4430 を使用し、Upper マーカーとして、分子サイズ210 kDa のミオシンを使用した。

なお、ラダー液とは、分子サイズの決定を行なうための分子量既知の標準サンプルであり、以下のものが各々74 ng/ml で含まれる：

リゾチーム (14.3 kDa)、 β -ラクトグロブリン (18.4 kDa)、カルボニックアンヒドラーゼ (29.0 kDa)、オボアルブミン (43.0 kDa)、血清アルブミン (68.0 kDa)、ホスホリラーゼB (97.4 kDa)、ミオシン (210 kDa)。

実施例 1

第1図A～Dは、従来法におけるタンパク質の前処理（熱変性処理）を行なった後にマイクロチップ型電気泳動を行なった場合のエレクトロフェログラムであり、第1図E～Mは熱変性処理を行なわない場合である。タンパク質として1 μ g/ μ l のウシ血清アルブミン (BSA) (SIGMA) を用いた。

移動時間20 s 前後の2本のピークはLower マーカー由来のもの、40 s 付近の1本のピークはUpper マーカー由来のものである。BSAのピークは25 s ～30 s のものである。

従来法：通常の方法 (Agilent Technologies 推奨の方法) による結果を第1図Aに示す。これに対し、第1図Bは熱変性処理の際、ジチオスレイトールを添加しないものである。また第1図Cは熱変性処理の際、サンプルバッファー (Agilent Technologies のキット内のもの

、SDS含有の緩衝液と考えられる)の代わりにSDSなしの脱イオン水(ICN Biomedicals, Inc. 社製)を用いたものであり、第1図Dは、脱イオン水を用い、ジチオスレイトールを添加しない系である。

その結果、脱イオン水を用いることにより、強度低下が認められた。これに対し、熱変性処理なしの場合で規定のサンプルバッファーとジチオスレイトールを添加したものは、強度が第1図より向上した(第1図E)。これはジチオスレイトールに因らなかった(第1図F)。

一方、熱変性処理なしでサンプルバッファーの代わりに脱イオン水にタンパク質を溶解させ、ジチオスレイトールを添加したものは劇的な強度増加を示した(第1図G)。これはジチオスレイトールなしでも同様であった(第1図H)。これらは、Upperマーカーを2倍濃度にして用いた場合も、全く同様であった(第1図L)。また、熱変性処理なしで脱イオン水を用いた系の強度の再現性は良好であった(第1図M)。

これらの結果より、熱変性処理を行わず、タンパク質をバッファーではなく水溶解した場合、スペクトル強度を8~10倍向上することができた。

実施例2

第2図はスペクトル強度の濃度変化を熱変性処理あり(従来法)となし(実施例1E記載)で比較したものである。第2図A~Jは熱変性処理ありのもの、第2図K~Sは熱変性処理なしで、実施例1記載の水を用い、ジチオスレイトールなしのものである。被検タンパク質であるBSAの濃度は、第2図A、K: $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B, L: $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C, M: $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D, N: $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, E: $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, F, O: $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, G, P: $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, H, Q: $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, I, R: $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, J, S: $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

これらの結果より、従来法(反応あり)の系では検出限界が $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

1であるのに対し、本発明の方法（反応なし）は $0.005\mu\text{g}/\mu\text{l}$ あり、10倍の感度上昇が認められた。

実施例 3

第3図は実施例2のスペクトル強度の濃度変化を熱変性処理あり（従来法）の再現性を調べたものである。被検タンパク質であるBSAの濃度は、第3図A～A' ' 'は $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、B～B' ' '： $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、C～C' ' '： $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、D～D' ' '： $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、E～E' ' '： $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、F～F' ' '： $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、G～G' ' '： $0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、H～H' ' '： $0.02\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、I～I' ' '： $0.01\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、J～J' ' '： $0.005\mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

これらの結果より、従来法（反応あり）の系の再現性は高く、検出限界が $0.05\sim 0.02\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であることがわかった。

実施例 4

第4図は実施例2のスペクトル強度の濃度変化を熱変性処理なし（実施例1E記載の水を用い、ジチオスレイトールなしのもの）の再現性を調べたものである。第4図A～A' ' 'はBSA $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、B～B' ' '： $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、C～C' ' '： $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、D～D' ' '： $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、F～F' ' '： $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、G～G' ' '： $0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、H～H' ' '： $0.02\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、I、I'、I' '： $0.01\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、J～J' ' '： $0.005\mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

これらの結果より、熱変性処理なしの系では再現性が高く、検出限界が $0.01\sim 0.005\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であることがわかった。

実施例 5

第5図は低濃度での検出を示す。第5図A-Cは、実施例1記載の本発明の方法の水を用い、ジチオスレイトールなしのものにさらに、LowerマーカーマたはUpperマーカのいずれか一方のマーカを標準濃度と比べて低濃度で用いた方法である。第5図Aは $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSAで通常のLowerマーカ濃度B： $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSAでLowerマーカ濃度を従来の $1/2$ で用いたもの、C： $0.001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSAで、Lowerマーカ濃度 $1/2$ にさらにUpperマーカ濃度を従来の $1/10$ で用いたものである。

第5図D-Jは、Lowerマーカが規定の $1/4$ に対し、被検タンパク質と同濃度のインシュリン（ウシ膵臓由来，SIGMA）をLowerマーカとしてさらに加えたものである。D： $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，E： $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，F： $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，G： $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，H： $0.001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，I： $0.0005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，J： $0.0001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。この方法により、BSAの検出限界が $0.0005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ まで可能となった。

実施例6

他のタンパク質についての検出限界を実施例5と同様に調べた。第6図A-Jは従来法（熱変性処理あり）によるミオグロビン（ウマ骨格筋由来，SIGMA）である。第6図B'、E'、H'、I'は同様の再現性をみたものである。第6図K-Oは従来法によるトリプシン（I型、ウシ膵臓由来，SIGMA）である。それぞれの濃度はA，K： $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，B，B'： $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，C： $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，D，L： $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，E，E'： $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，F： $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，M： $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，H，H'，N： $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，I，I'，O： $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，J： $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。この方法により、ミオグロビン、トリプシンの検出限界はいずれも $0.05 \sim 0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。これは、BSAの場合と一致した。

実施例 7

ミオグロビンおよびBSAについて、熱変性処理ありの系における従来法と、Lowerマーカーとして、被検タンパク質と実質的に同等もしくは近似した量のマーカー（ここでは便宜上、可変濃度マーカーとよぶ）を用いたものとの比較を行なった。

第7図A～Iは従来法（熱変性処理あり）によるミオグロビンである。第7図A'～I'は熱変性処理ありであるが可変濃度マーカーを用いている。第7図J～Rは従来法（熱変性処理あり）によるBSAである。第7図J'～R'は熱変性処理ありであるが可変濃度マーカーを用いている。それぞれ、可変濃度マーカーとしてインスリンを用いた。それぞれの可変マーカーの濃度はA, A', J, J' : $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B, B, K : $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C, C', L, L' : $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D, D', M, M' : $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, E, E', N : $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, F, F', O, O' : $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, G, G', P, P' : $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, H, H', Q, Q' : $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, I, I', R' : $0.005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ である。

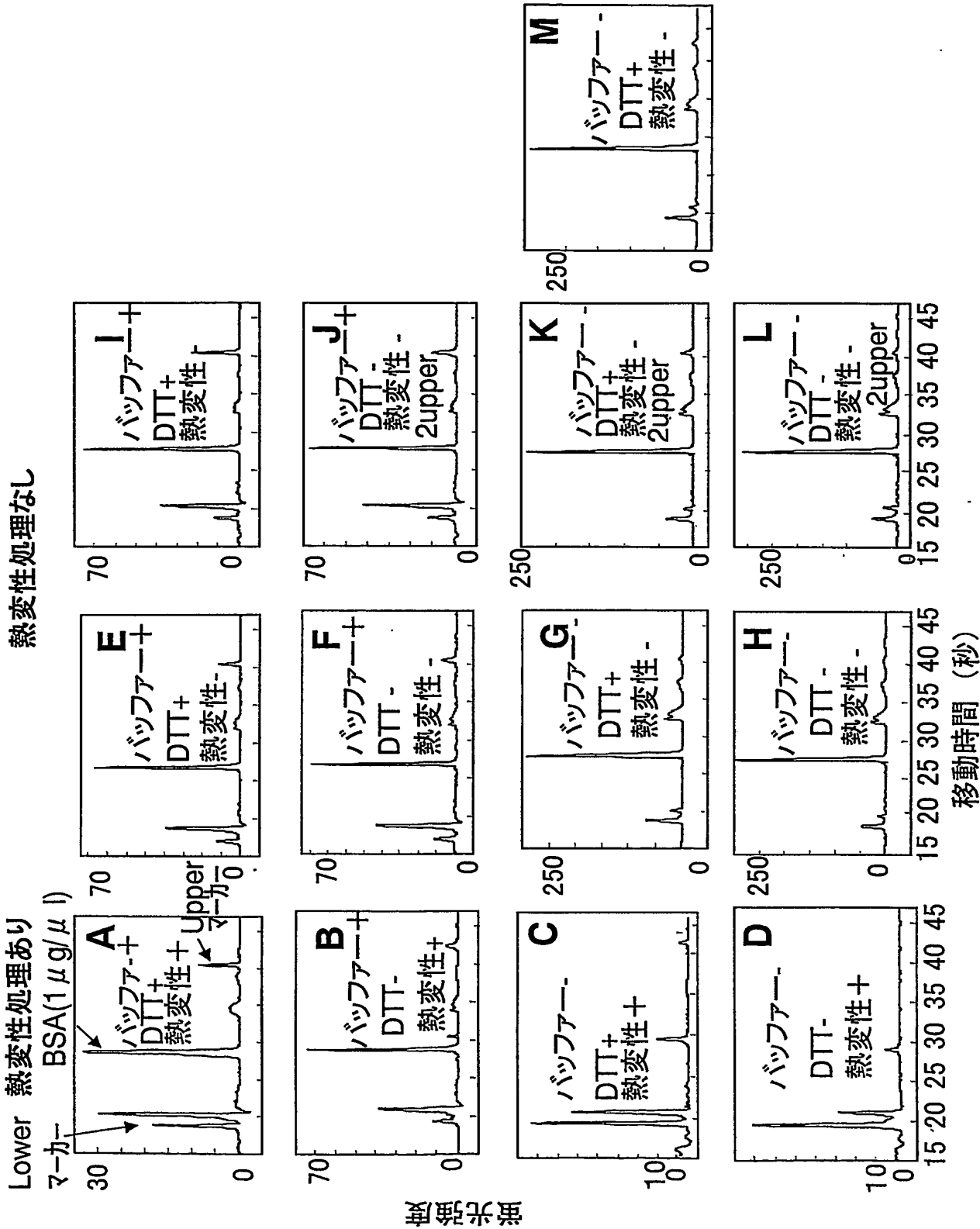
従来法でミオグロビン、BSAは検出限界 $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ であるのに対し、可変濃度マーカーを用いた場合には $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となったが、反応なしの実施例6の系と比べて劇的な向上ではなかった。しかしながら、反応ありの場合でも可変濃度マーカーの効果があることがわかった。

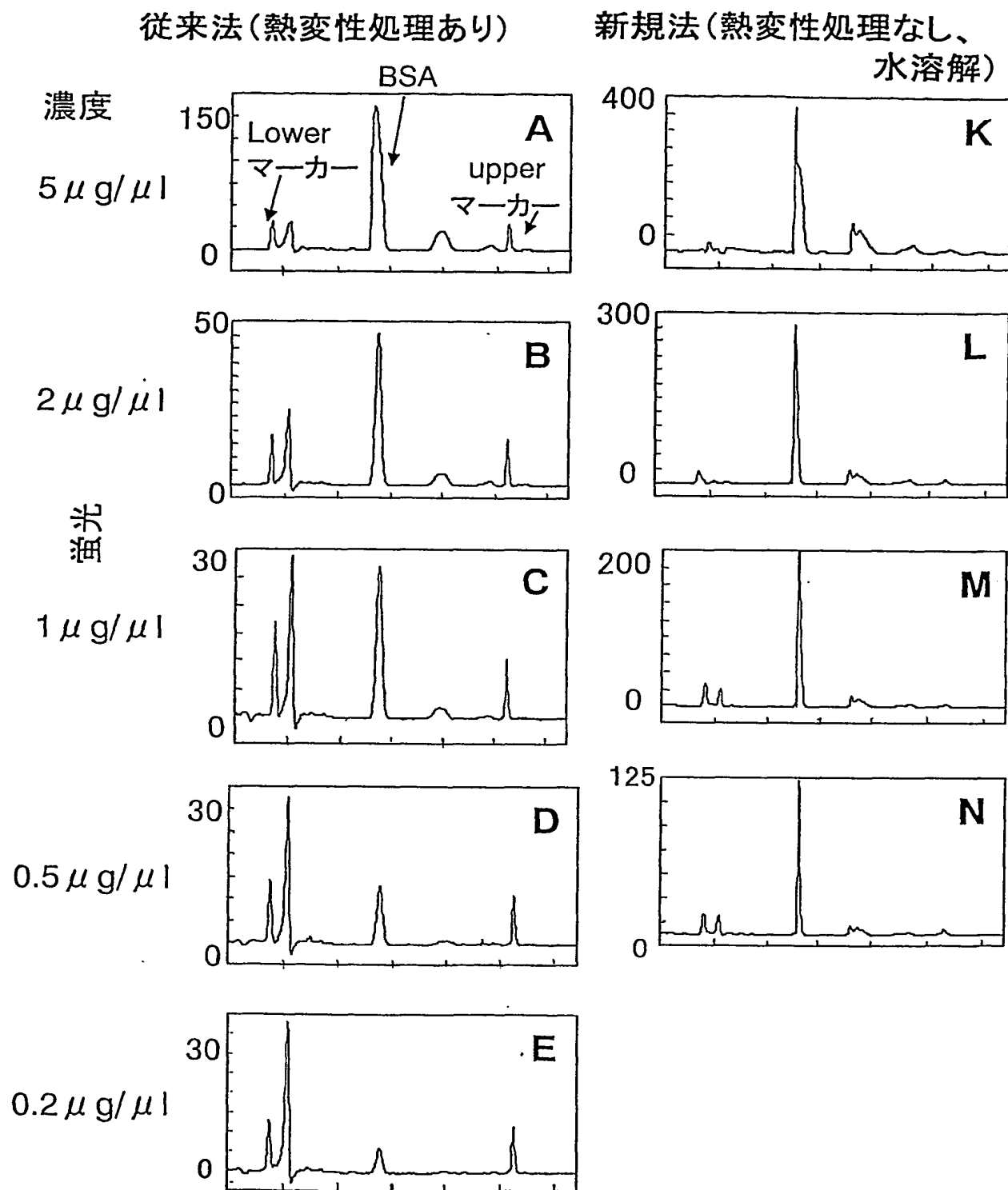
産業上の利用可能性

本発明によれば、熱変性の前処理工程を行わずにネイティブな状態でタンパク質を迅速に解析することができ、なおかつより高感度な電気泳動法が提供される。従って、本発明のタンパク質の電気泳動法は、プロテオソーム解析および医療診断に有用である。

請求の範囲

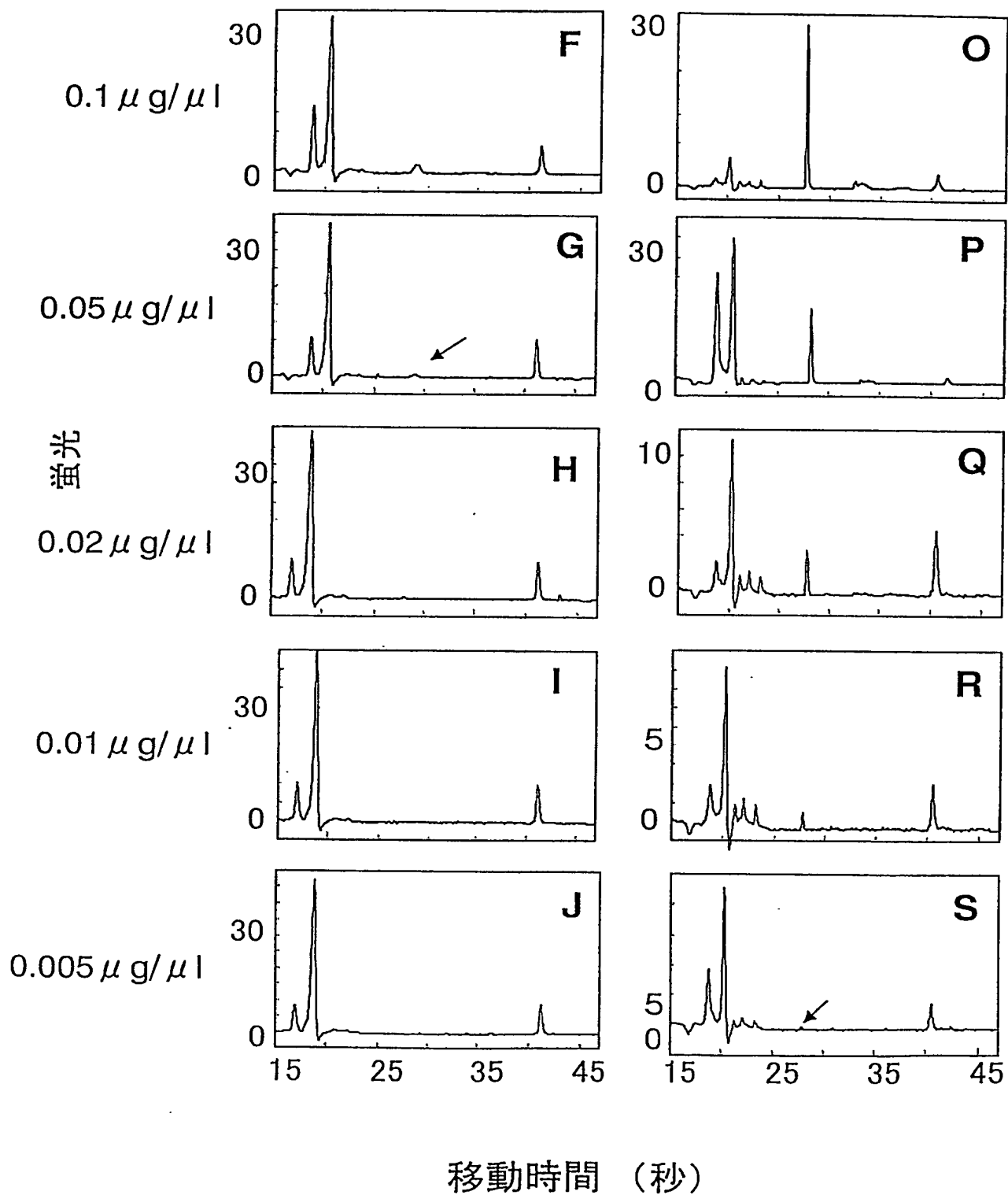
1. タンパク質を熱変性処理することなくサイズ分離の電気泳動に供することを特徴とする電気泳動法。
2. 水溶解させたタンパク質を電気泳動に供することを特徴とする請求項 1 記載の電気泳動法。
3. 2 つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの少なくとも 1 つを標準濃度と比較して低濃度とすることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の電気泳動法。
4. 2 つまたはそれ以上の分子量マーカーをタンパク質と共に電気泳動に供し、該マーカーの 1 つを被検タンパク質の濃度の $1/10 \sim 10$ 倍の濃度にすることを特徴とする請求項 1 ～ 3 いずれか記載の電気泳動法。
5. 電気泳動の形態が、キャピラリー電気泳動法、マイクロチップ型電気泳動法およびナノチャンネル型電気泳動法からなる群より選択されたものである請求項 1 ～ 4 いずれか記載の電気泳動法。



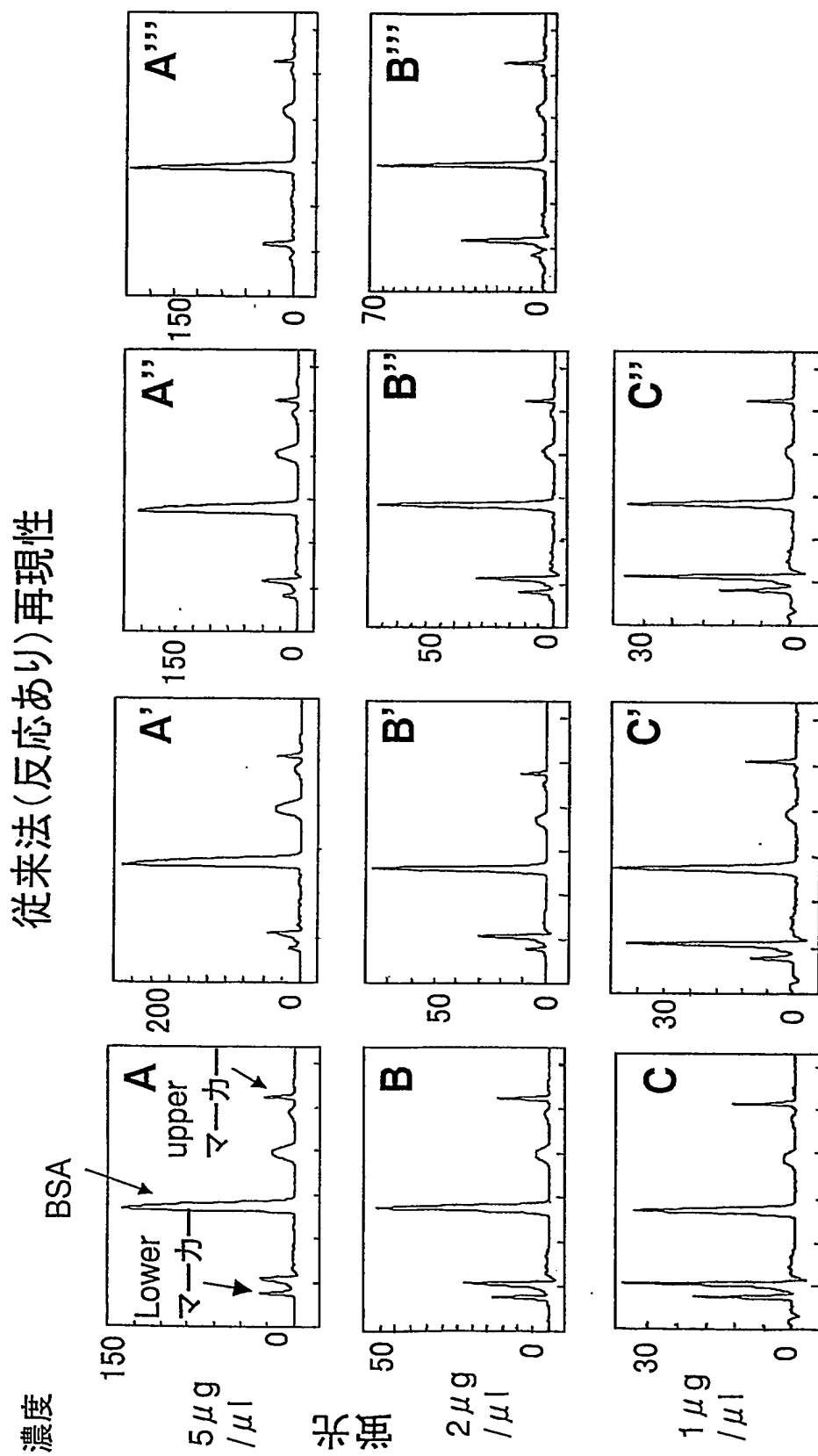


第 2 図

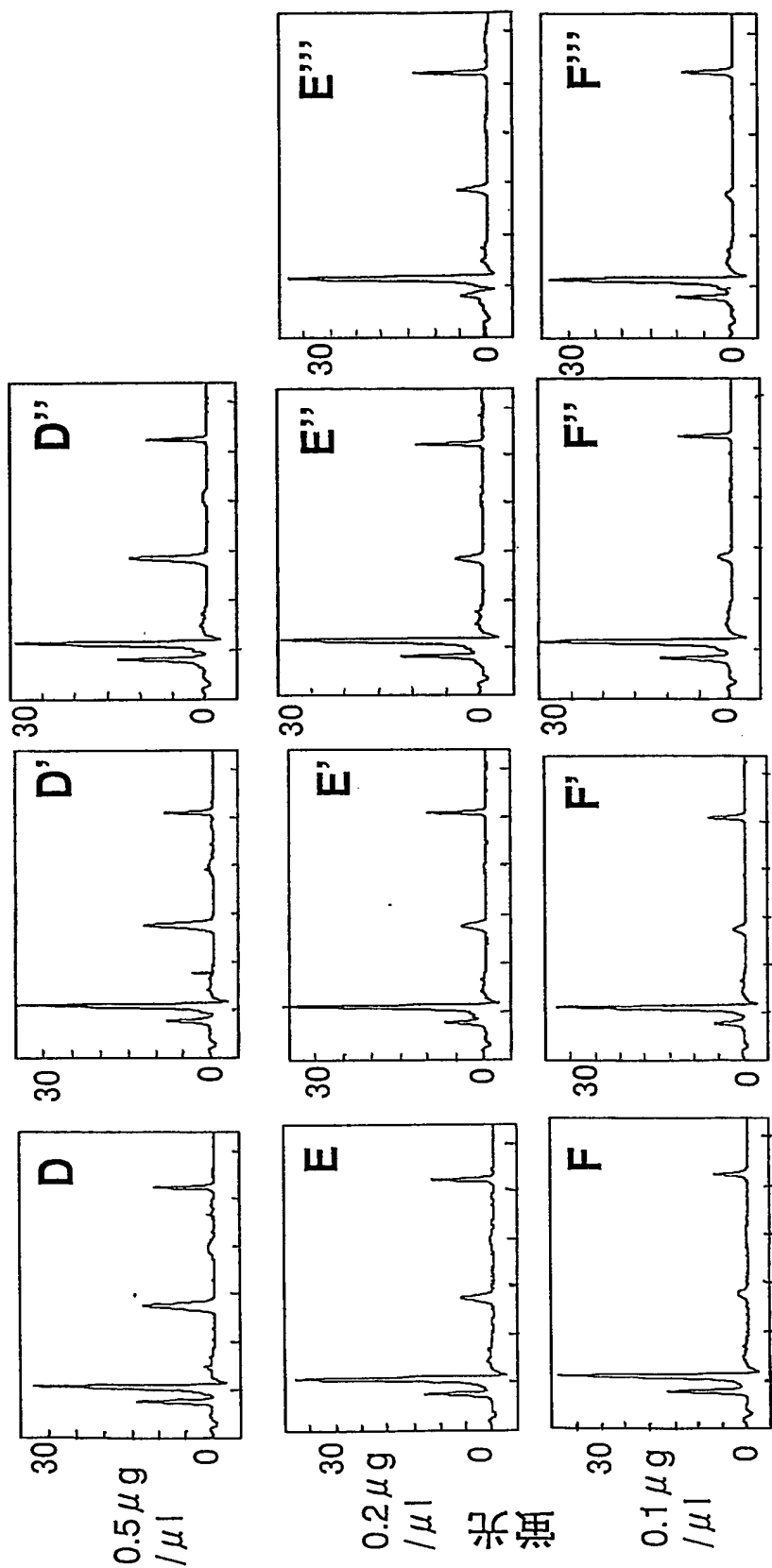
2/16



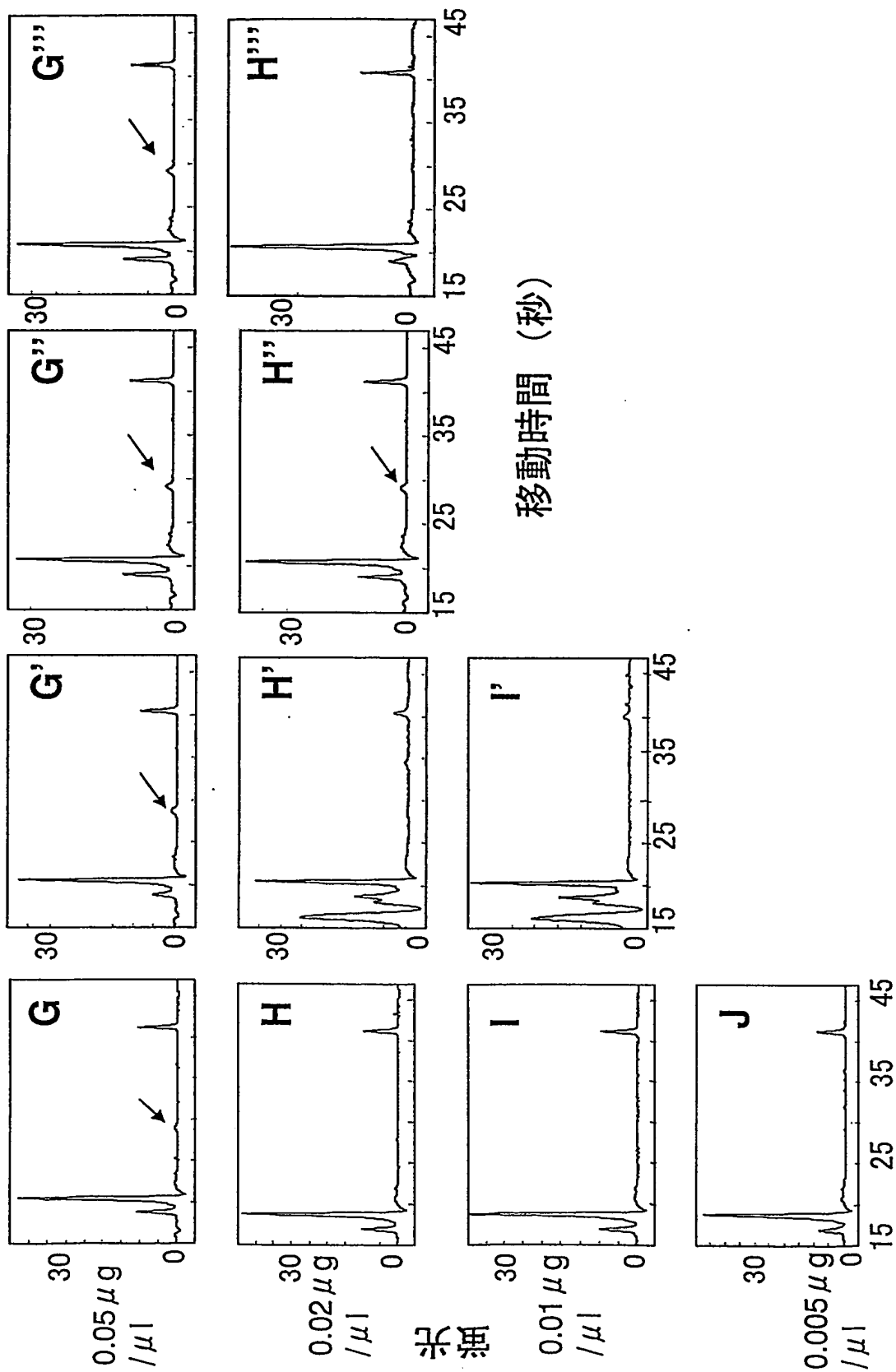
第2図の続き
3/16



第3図
4/16

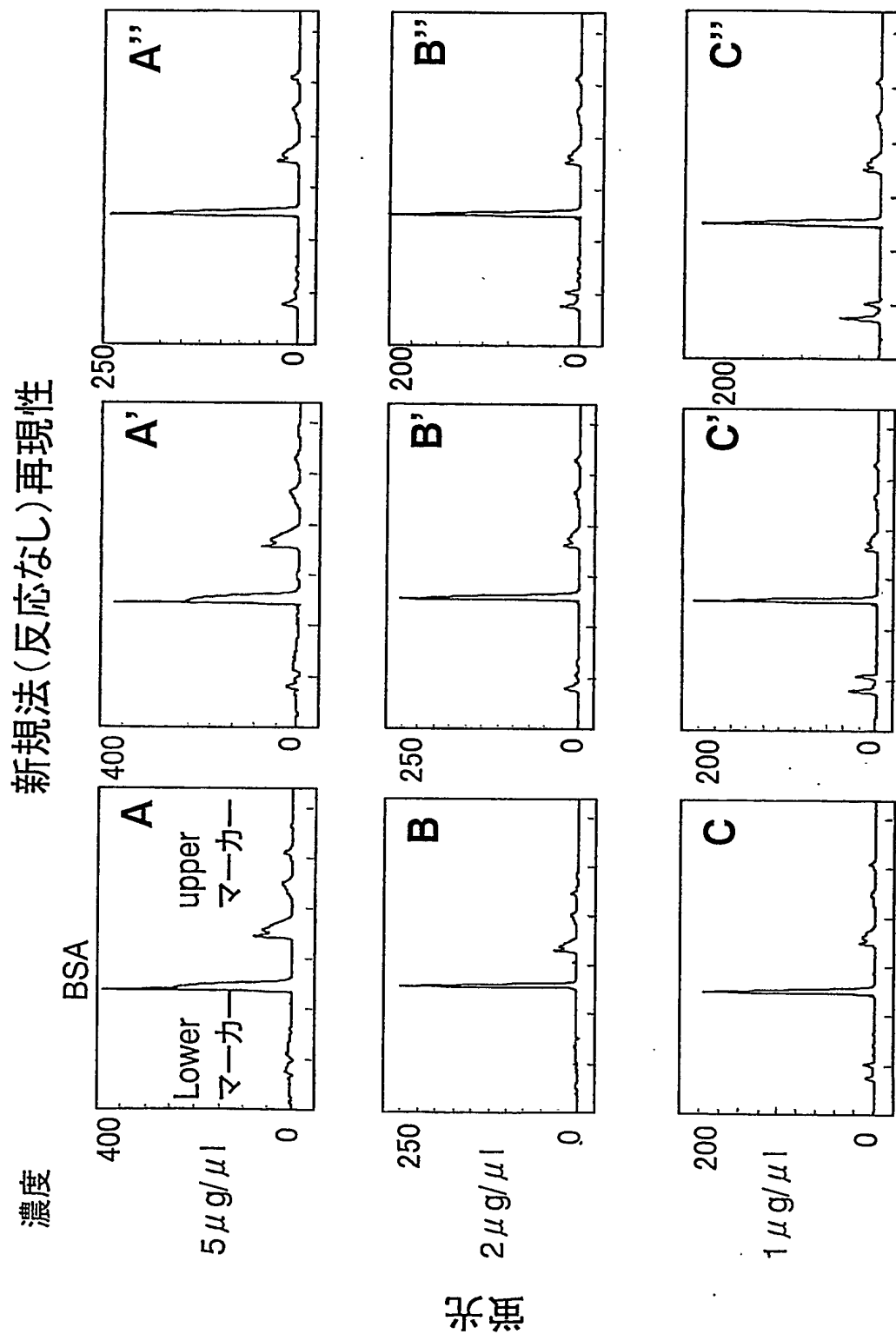


第 3 図の続き
5/16

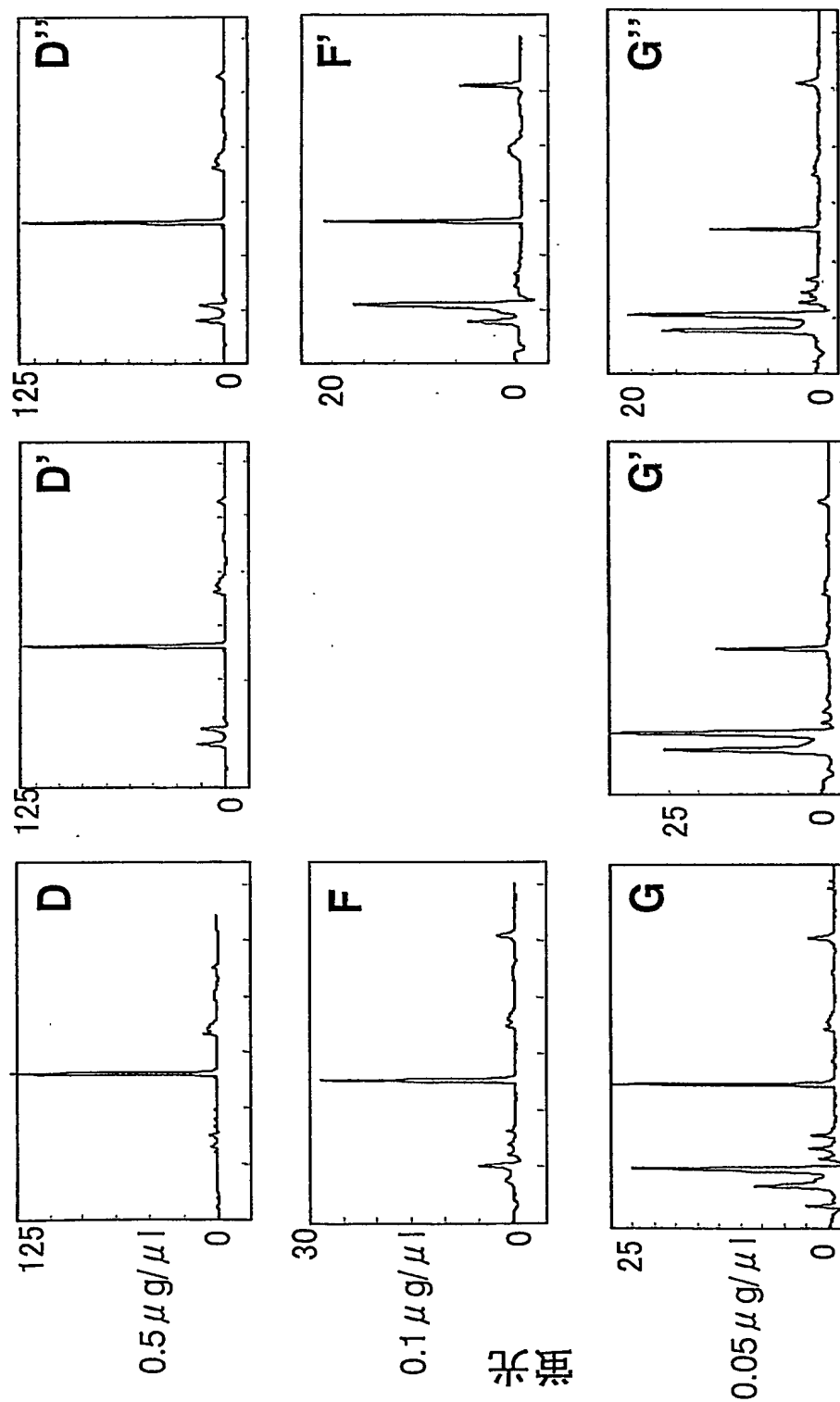


移動時間 (秒)

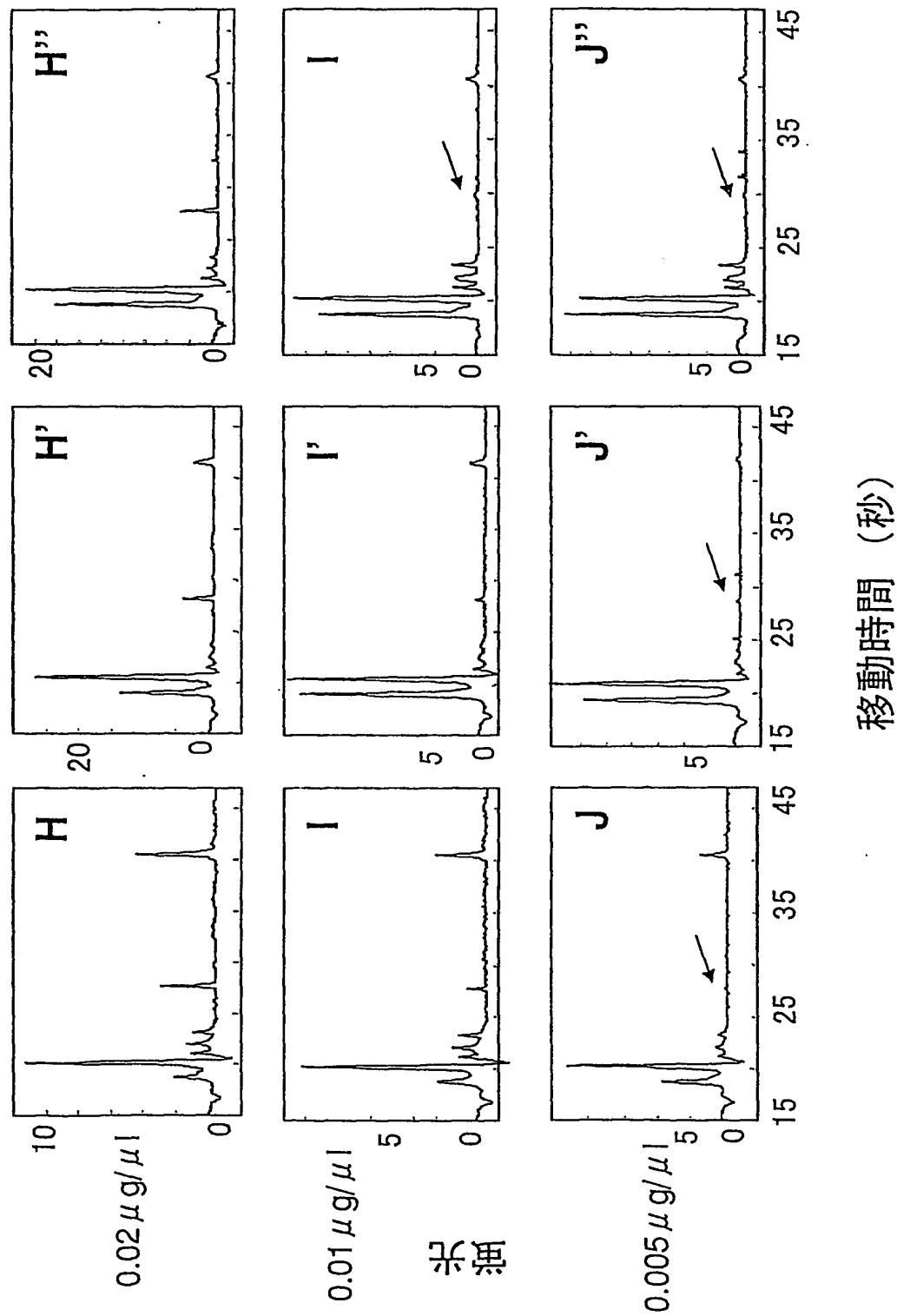
第3図の続き
6/16



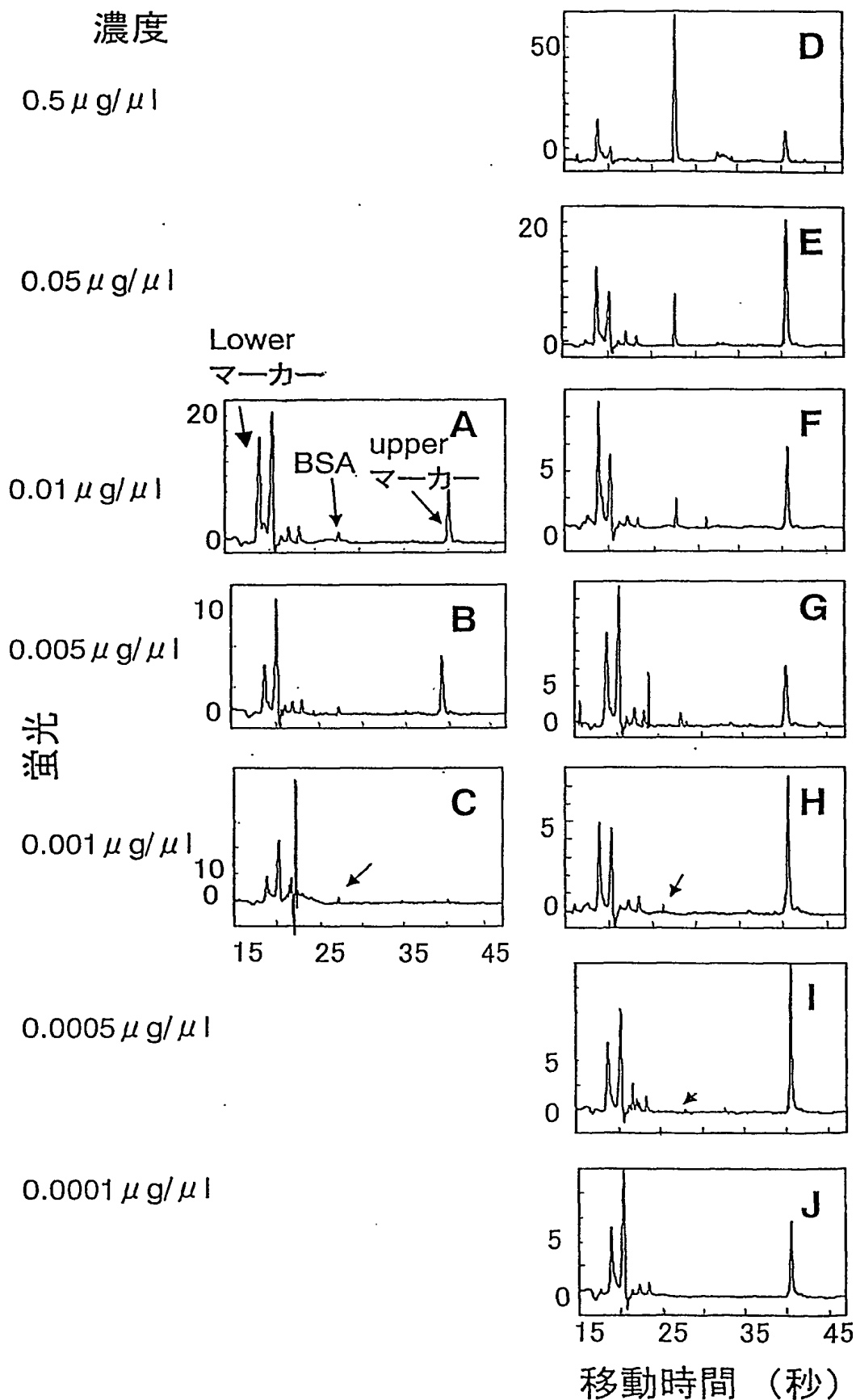
第 4 図
7/16



第4図の続き
8/16

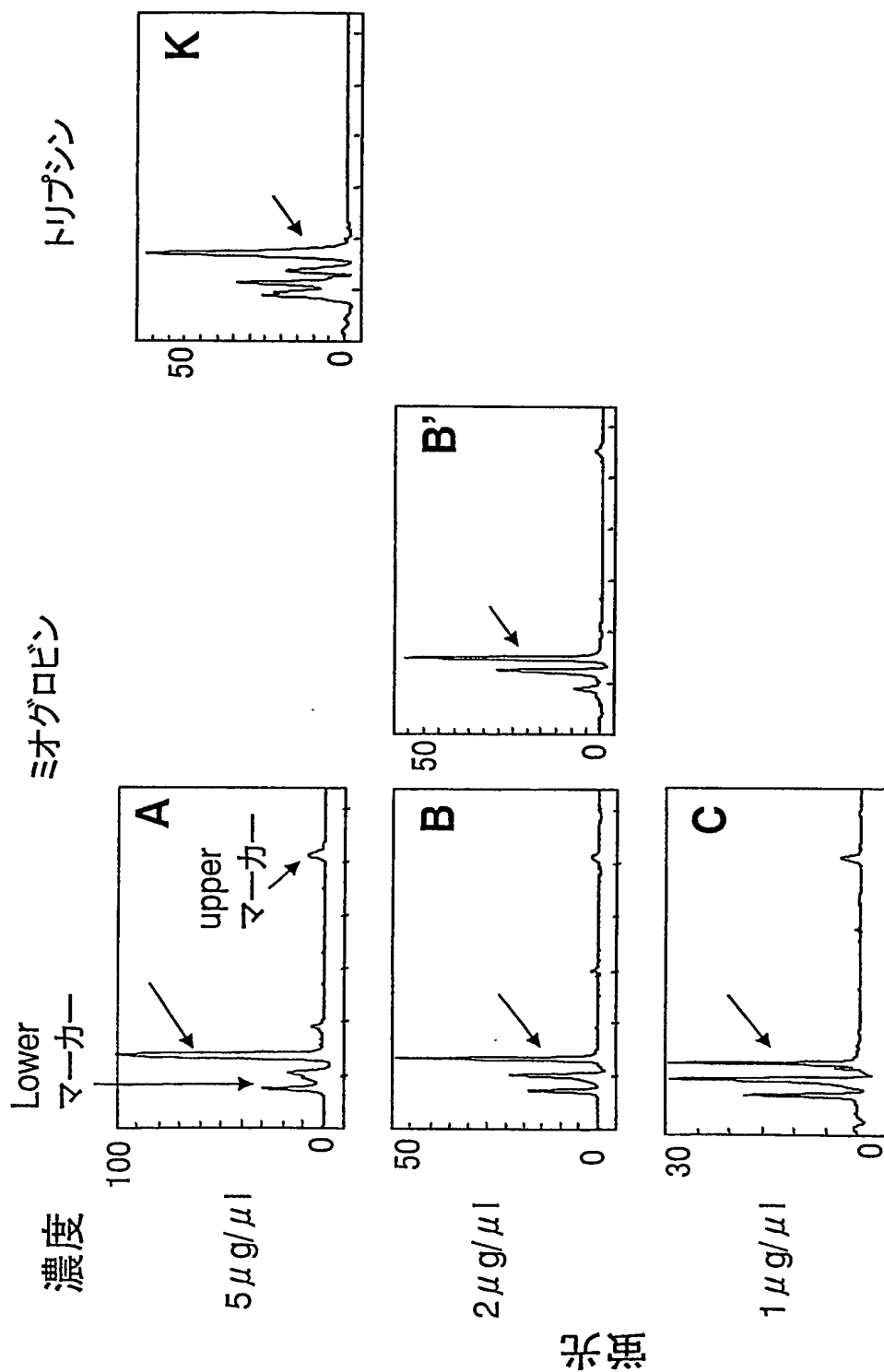


第4図の続き
9/16

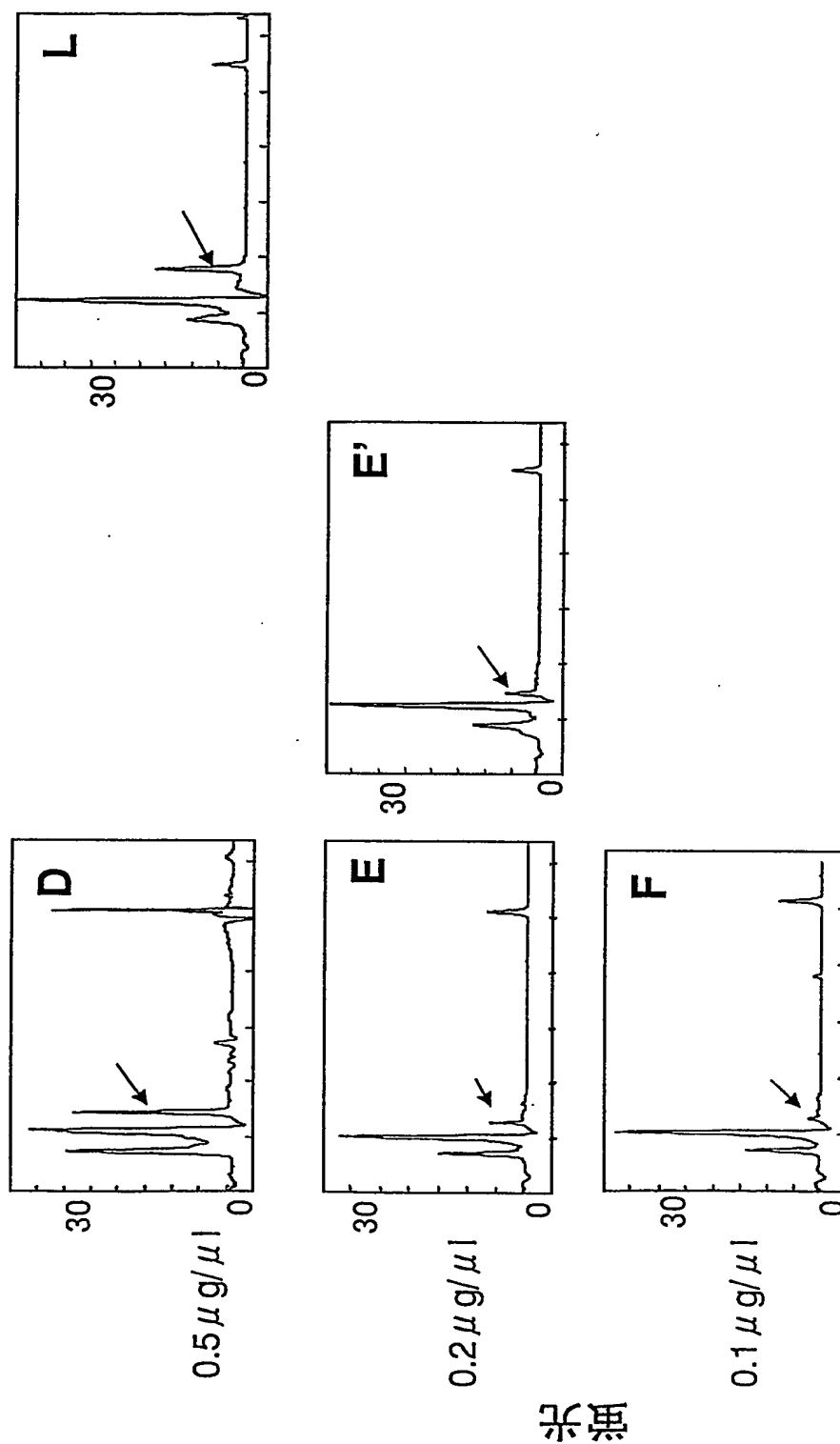


第5図

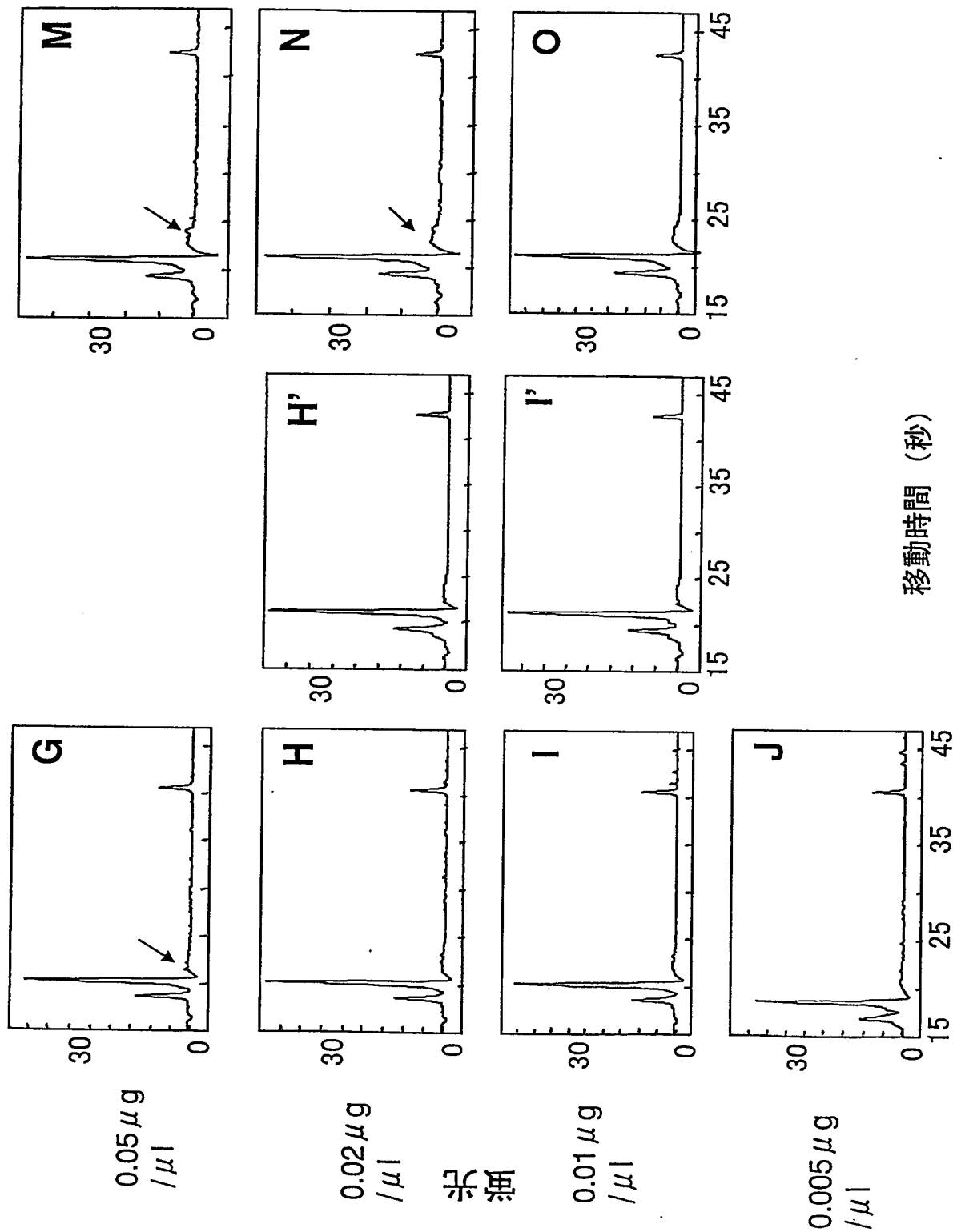
10/16



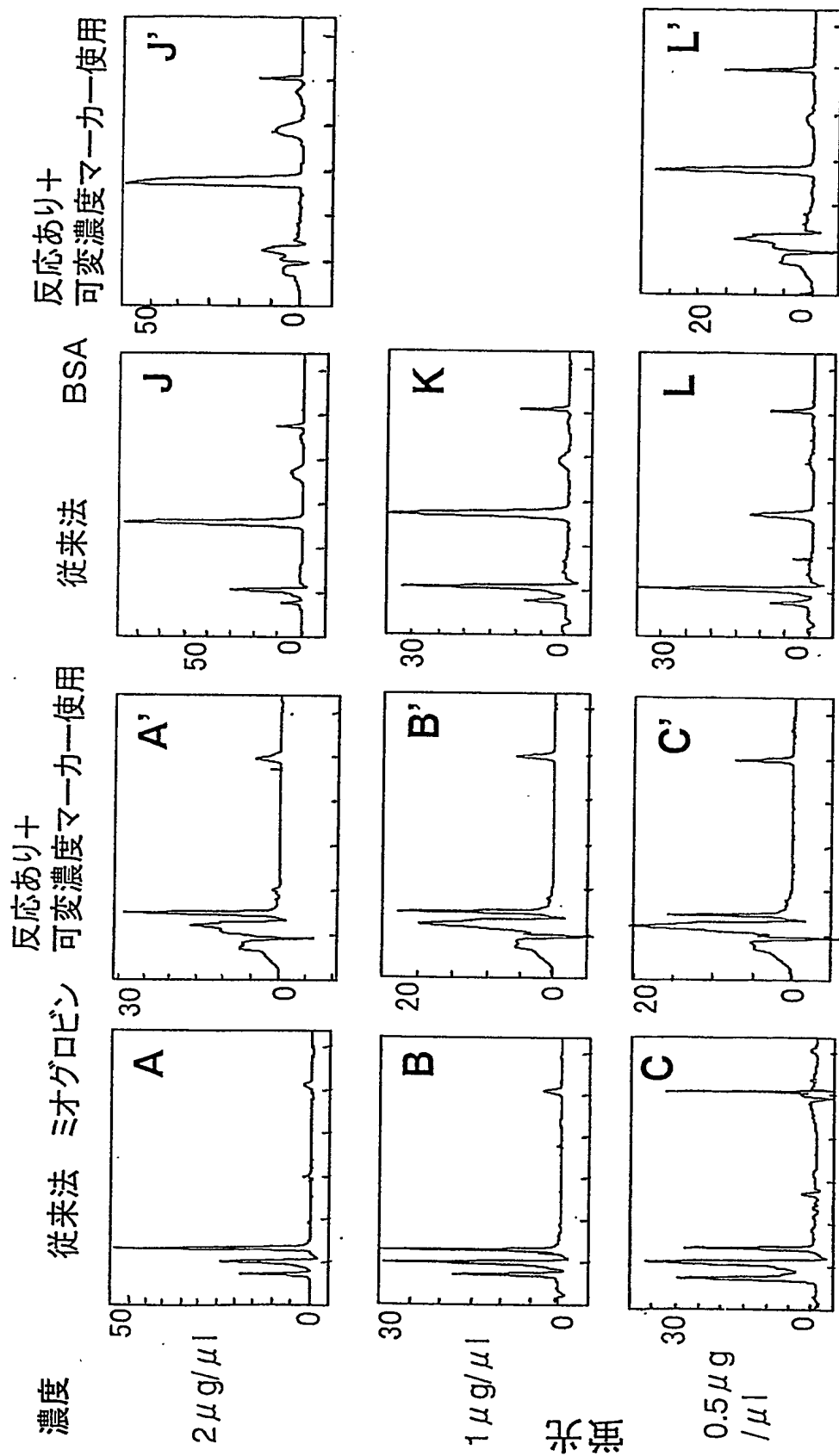
第6図
11/16



第 6 図の続き
12/16

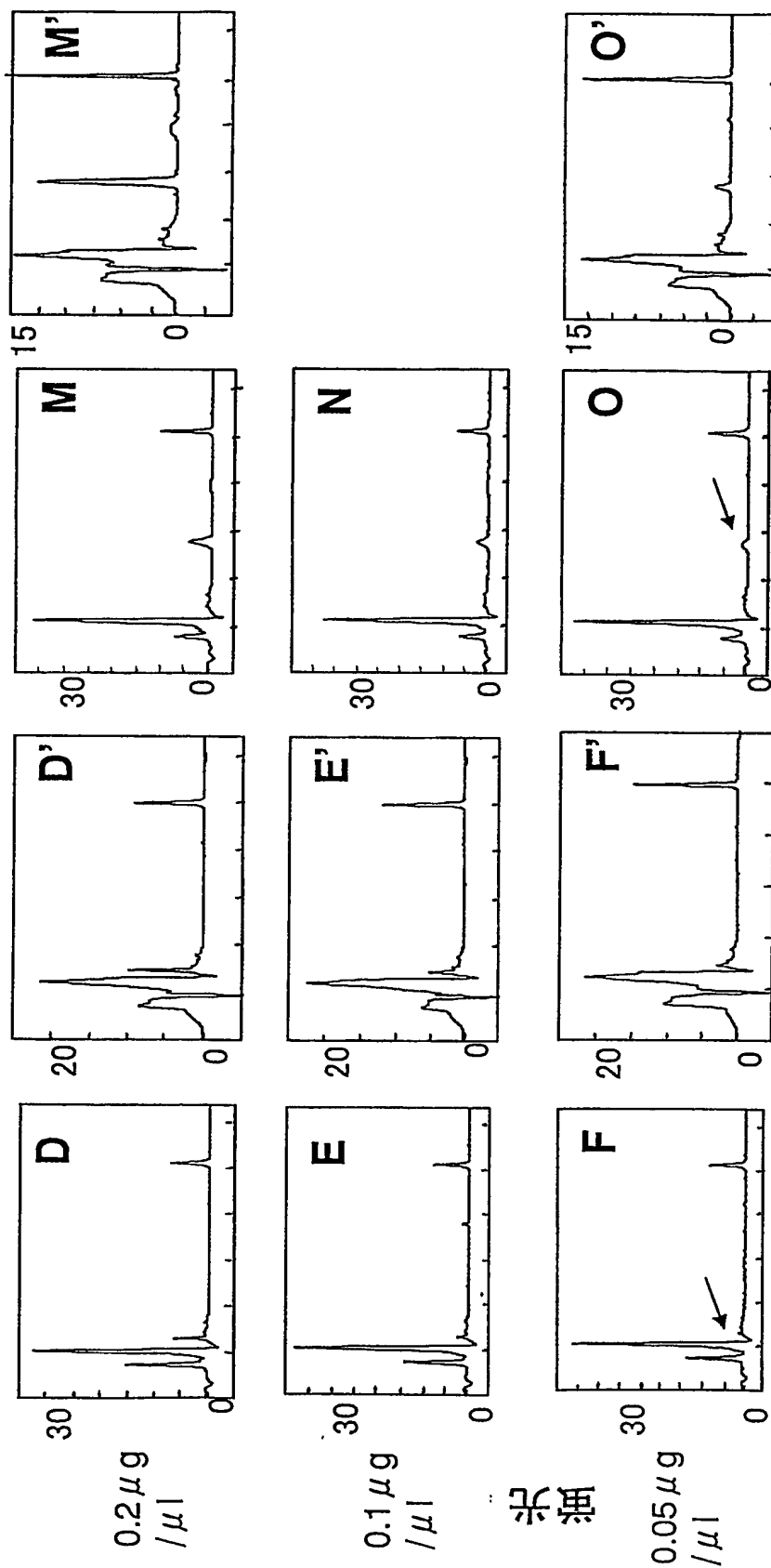


第 6 図の続き
13/16

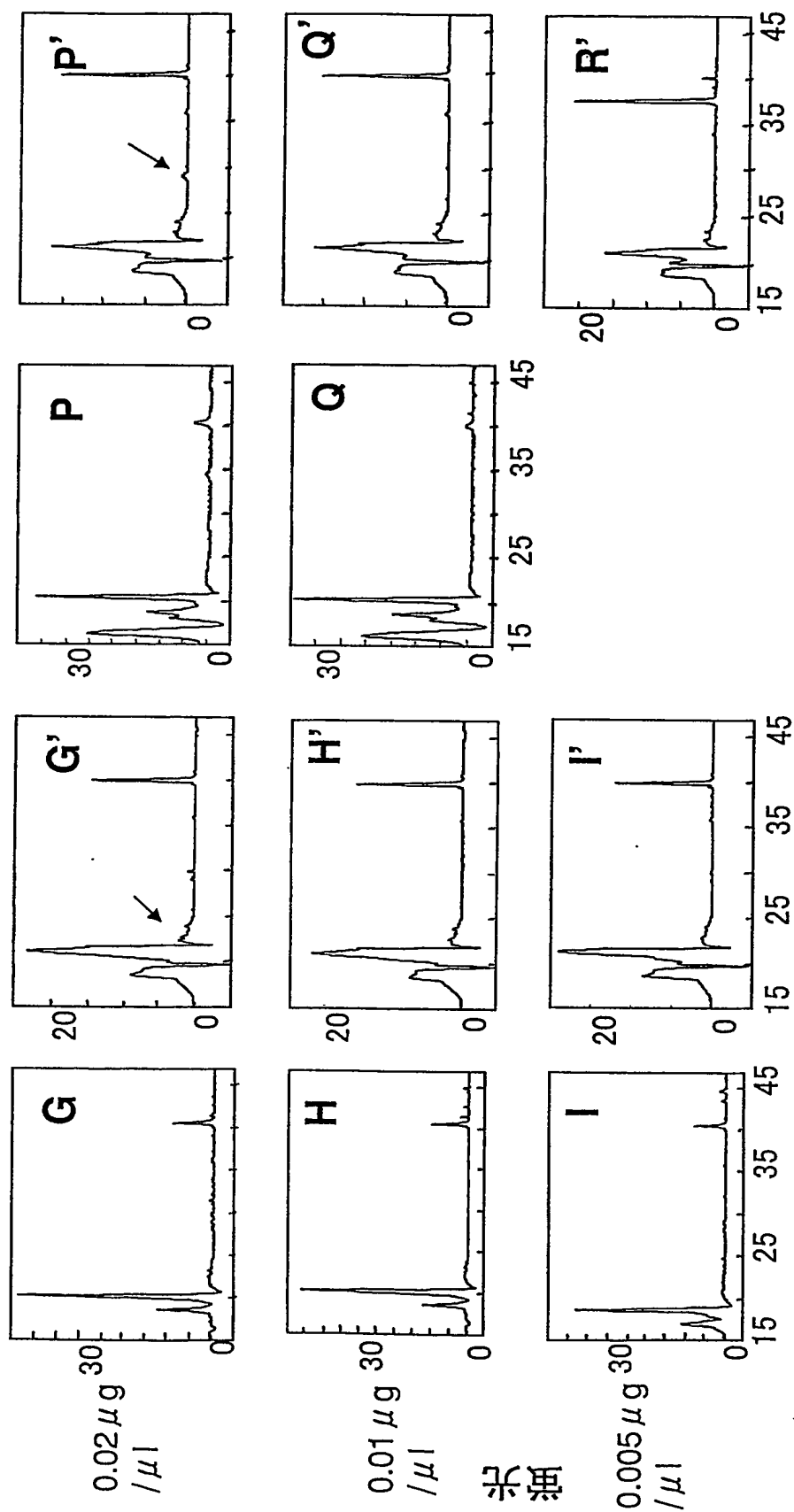


第7図

14/16



第7図の続き
15/16



第7図の続き

16/16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/13491

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N27/447

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Edited by Japanese Electrophoresis Society, "Saishin Denki Eido Jikkenho", Ishiyaku Pub., Inc., 25 February, 1999 (25.02.99), pages 54 to 60	1-5
X	Edited by Hiroshi TERADA, "Tanpakushitsu to Kakusan no Bunri Seisei -Kiso to Jikken-", Kabushiki Kaisha Hirokawa Shoten, 15 June, 2001 (15.06.01), pages 66 to 68	1,2
X	Masaaki MORITA, "Shokuhinchu no Tenka Tanpakushitsu Bunsekiho no Kento", Norin Suisan Shohi Senta Chosa Kenkyu Hokokusho, August, 1996, No.20, pages 45 to 54	1-5
X	Edited by Koichiro AOKI, Hiroshi NAGAI, "Saishin Denki Eidoho", Kabushiki Kaisha Hirokawa Shoten, 01 April, 1978 (01.04.78), pages 274 to 278	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	---

Date of the actual completion of the international search 08 April, 2003 (08.04.03)	Date of mailing of the international search report 22 April, 2003 (22.04.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13491

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5693291 A (Boehringer Mannheim GmbH.), 02 December, 1997 (02.12.97), Column 4, lines 45 to 56 & DE 295014396 U & EP 760483 A & JP 9-166598 A	3, 4
A	WO 99/66325 A (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB), 23 December, 1999 (23.12.99), Page 11, line 33 to page 12, line 12 & EP 1088227 A & JP 2002-518675 A	3, 4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/447

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/447

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2003年

日本国登録実用新案公報 1994-2003年

日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	日本電気泳動学会編, 最新 電気泳動実験法, 医歯薬出版株式会社, 1999. 02. 25, p. 54-60	1-5
X	寺田弘編, 蛋白質と核酸の分離精製-基礎と実験-, 株式会社廣川書店, 2001. 06. 15, p. 66-68	1, 2
X	森田正晶, 食品中の添加タンパク質分析法の検討, 農林水産消費センター調査研究報告書, 1996. 08, 第20号, p. 45-54,	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.04.03

国際調査報告の発送日

22.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 靖典



2J

3010

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	青木幸一郎、永井裕編, 最新 電気泳動法, 株式会社廣川書店, 1978. 04. 01, p. 274-278	1
A	US 5693291 A (Boehringer Mannheim GmbH) 1997. 12. 02, 第4カラム第45-56行 & DE 295014396 U & EP 760483 A & JP 9-166598 A	3, 4
A	WO 99/66325 A (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB) 1999. 12. 23, 第11頁第33行~第12頁第12行 & EP 1088227 A & JP 2002-518675 A	3, 4